

Proline and hydroxy:proline prodn. useful for carba:penem antibiotic prodn.

Publication number: DE4341283 (A1)

Publication date: 1994-07-07

Inventor(s): NIYOSHI SHISUKE [JP]; KANAMORI HIRONORI [JP]; SATO NANAMI [JP] +

Applicant(s): SHOWA SANGYO CO [JP] +

Classification:

- international: C07C227/18; C07D207/16; C12P13/04; C12P21/06; C07C227/00; C07D207/00; C12P13/00; C12P21/06; (IPC1-7): A61K31/43; C07C227/18; C07C229/08; C07C229/24; C07C229/36; C07D207/16; C07K15/06; C07K15/10; C07K15/20; C12N1/20; C12N1/20; C12P13/04; C12P13/04; C12P13/24; C12P13/24; C12R1/64; C12R1/64; C12R1/64

- European: C07C227/18; C07D207/16; C12P13/04; C12P21/06

Application number: DE19934341283 19931203

Priority number(s): JP19920350320 19921203

Abstract of DE 4341283 (A1)

Prodn. of aminoacids from proteins or peptides contg. proline (Pro) and/or hydroxyproline (Hypro) residues that are difficult to degrade is by using cells, pref. in an aq. medium, from *Xanthomonas* (X.) or its prod. which hydrolyses the protein or peptide. Pref., X. is *X. maltophilia* (malt.) or X. JCM 3857 (FERM-BP-4475), X. malt. NA-62 (FERM-BP-4479) or JCM 3007 (FERM-BP-4474). The proteins to be degraded are pref. collagen, casein or prolamine. Also claimed is method for prodn. of trans-4-hydroxy-L-proline by applying cells or a cell prod. of X. capable of hydrolysing the protein or peptide and isolating trans-4-hydroxy-L-proline. The ability to hydrolyse proteins or peptides that are difficult to degrade has the pref. meaning that all of benzyloxycarbonyl gp. (Z)-Pro-Pro, Z-Pro-hypro and Z-glycine-Pro can be hydrolysed

.....
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide



⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑬ **DE 43 41 283 A 1**

⑲ Aktenzeichen: P 43 41 283.1
⑳ Anmeldezeitpunkt: 3. 12. 93
㉑ Offenlegungstag: 7. 7. 94

⑤① Int. CL.5:
C 12 P 13/04
C 12 N 1/20
C 12 P 13/24
C 07 C 227/18
C 07 D 207/16
// (C12P 13/04, C12R
1:64) (C12N 1/20,
C12R 1:64) C07K
15/20, 15/06, 15/10
(C12P 13/24, C12R
1:64) A61 K 31/43,
C07C 229/08, 229/36,
229/24

DE 43 41 283 A 1

③ Unionspriorität: ③② ③③ ③④

03.12.92 JP 350320/92

⑦① Anmelder:

Showa Sangyo Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

⑦② Vertreter:

Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann,
D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Hermann, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.;
Schmidt, J., Dipl.-Ing.; Jaenichen, H., Dipl.-Biol.
Dr.rer.nat., 81675 München; von
Uexküll-Güldenband-Menzel, A., Dr.phil. (Ph.D.),
82166 Gräfelfing; Weinberger, R., Dipl.-Chem.Univ.
Dr.rer.nat.; Buback, W., Dipl.-Chem. Univ.,
Pat.-Anwälte; Tremmel, H., Rechtsanwalt., 81675
München

⑦③ Erfinder:

Niyoshi, Shisuke, Funabashi, Chiba, JP; Kanamori,
Hironori, Funabashi, Chiba, JP; Sato, Nanami,
Funabashi, Chiba, JP

⑤④ Verfahren zur Aminosäureherstellung

⑤⑤ Ein Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren wird bereitgestellt, bei dem man auf ein Protein oder Peptid, das schwierig abzubauen ist und Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthält, Zellen eines Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas, der die Fähigkeit besitzt, das Protein oder Peptid zu hydrolysieren, oder ein behandeltes Produkt der Zellen mit den Fähigkeiten einwirken läßt und die erzeugte Aminosäure gewinnt.

Mit dieser Erfindung können Aminosäuren mit einem hohen Nutzwert, beispielsweise Prolin und/oder Hydroxyprolin, von einem Protein oder Peptid hergestellt werden, das viel Prolin und/oder Hydroxyprolin enthält, beispielsweise Collagen, Casein oder Prolamin. Mit dieser Erfindung kann auch trans-4-Hydroxy-L-prolin von einem derartigen schwer abbaubaren Protein oder Peptid effizient und selektiv hergestellt werden.

DE 43 41 283 A 1

Beschreibung

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer (von) Aminosäure(n), die einen hohen Nutzwert aufweist(en), aus einem schwer abbaubaren Protein oder Peptid, das Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthält.

Bekannte Proteine, die zahlreiche Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthalten, sind tierisches Collagen, Casein, etc. und pflanzliches Proteinin etc. Diese Proteine werden als Ausgangsverbindungen zur Herstellung eines Gemisches gelöster Aminosäuren durch Hydrolyse und/oder Abtrennung (einer) bestimmter(n) Aminosäure(n) aus der Lösung verwendet.

Die Hydrolyse dieser Proteinverbindungen wurde ausschließlich auf chemischem Wege mit einer Säure, einem Alkali oder einer entsprechenden Verbindung durchgeführt, da Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthaltende Peptide mit üblichen Proteasen unzureichend hydrolysiert und oft als schwer abbaubare Peptide verbleiben, die nicht weiter hydrolysiert werden (R. Walter, W. H. Sinnmons und T. Yoshimoto, Mol. Cell. Biochem. 30 (1980) 111). Man hielt es für praktisch unmöglich, sie vollständig mit Enzymen zu hydrolysieren.

Außerdem wird berichtet, daß eine chemische Hydrolyse unter scharfen Reaktionsbedingungen zu einer minderen Qualität der produzierten Aminosäuren führt und daß zudem während der Umsetzung carcinogene Stoffe entstehen (M. R. Williams und M. F. Dutton, Journal of Food Protection 45 (1988) 887). Daher war es wünschenswert, ein neues Verfahren zu entwickeln, durch das solche Proteinverbindungen unter milderen Bedingungen hydrolysiert werden können.

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Carboxypeptidasen gefunden, die den Abbau des C-terminalen Prolins einer Peptidkette bewirken. Man weiß beispielsweise (Kubota et al., J. Biochem. 74 (1973) 757; Kubota et al., Protein * Nucleic Acid * Enzyme 28 (1983) 1407), daß Carboxypeptidase C_N und Carboxypeptidase C_U, die von in Japan angebauten Zitrusfrüchten stammen, beispielsweise Natsumikan (Sommermandarine) und Unshu-mikan (Unshu-Mandarine). Aminosäuren, einschließlich Prolin, das besonders resistent gegenüber einer Hydrolyse durch Proteasen ist, freisetzen können, ähnlich der von Zuber gefundenen Carboxypeptidase C (Nature 201 (1964) 613). Die Geschwindigkeiten, mit denen diese Carboxypeptidasen Prolin freisetzen, sind jedoch sehr gering. Sie sind daher für die industrielle Anwendung ungeeignet. Eine Carboxypeptidase, die von einem zur Gattung Pycnopus gehörenden Mikroorganismus stammt, kann ebenfalls das C-terminale Prolin eines Peptids freisetzen, allerdings mit geringer Effizienz (japanische veröffentlichte, nicht-geprüfte Patentanmeldung Nr. 201987/1983).

Weitere bekannte Carboxypeptidasen sind beispielsweise die Carboxypeptidase P, die von der Kulturbrühe eines zur Gattung Penicillium gehörenden Mikroorganismus erhalten wird (Yokoyama, Protein * Nucleic Acid * Enzyme 28 (1983) 1414), und die Carboxypeptidase Y, die von einer Bäckerhefe stammt (Hayashi, Protein * Nucleic Acid * Enzyme 28 (1983) 1421). Beide können recht wirksam das C-terminale Prolin eines Peptids freisetzen, weisen allerdings den Nachteil auf, daß ihre Wirkung auf eine Prolinprolinbindung eines Peptids, in dem mehrere Prolinreste hintereinander vorkommen, gering ist.

Daher sind alle bisher bekannten Carboxypeptidasen für die Herstellung in industriellem Maßstab von Aminosäuren, wie Hydroxyprolin und Prolin, aus schwer abbaubaren Proteinen oder Peptiden, die Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthalten, unzureichend.

Andererseits sind Hydroxyprolin und Prolin als Grundstoffe zur Herstellung von verschiedenen Arzneimitteln besonders nützlich. Beispielsweise ist trans-4-Hydroxy-L-prolin ein Hydroxyprolin, das in schwer abbaubaren Proteinen oder Peptiden enthalten ist, die Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthalten, und als ein Grundstoff zur Herstellung von Carbapenem-Antibiotika nützlich (japanische veröffentlichte, nicht-geprüfte Patentanmeldung Nr. 236980/1993).

Eine Anmeldung einer Carboxypeptidase, die die "Hydrolyse der Prolinprolinbindung von Peptiden, in denen mehrere Prolinreste hintereinander vorkommen, katalysieren" kann, und ein Verfahren zu ihrer Herstellung ist beim japanischen Patentamt eingereicht worden (am 17. September 1993 veröffentlichte, japanische veröffentlichte, nicht-geprüfte Patentanmeldung Nr. 236980/1993).

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer Aminosäure durch Hydrolyse eines Proteins oder Peptids, das schwierig abzubauen ist und Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthält, beispielsweise Collagen, Casein oder Proteinin unter milden Bedingungen ohne Verwendung einer Säure oder eines Alkali und von scharfen Reaktionsbedingungen.

Eine besondere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur sehr effizienten Herstellung von Hydroxyprolin, Prolin oder eines Aminosäuregemisches durch Hydrolyse eines solchen schwer abbaubaren Proteins oder Peptids gemäß einem Enzymverfahren, d. h., durch Wirken eines Mikroorganismus oder eines behandelten Produkts von Zellen.

Eine besondere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur sehr effizienten und selektiven Herstellung von trans-4-Hydroxy-L-prolin, das als ein Grundstoff zur Herstellung von Carbapenem-Antibiotika besonders nützlich ist, durch Hydrolyse eines solchen schwer abbaubaren Proteins oder Peptids gemäß einem Enzymverfahren.

Diese Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch ein Verfahren zur Herstellung einer Aminosäure gelöst, bei dem man auf ein Protein oder Peptid, das schwierig abzubauen ist und Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthält, Zellen eines Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas, der die Fähigkeit besitzt, das Protein oder Peptid zu hydrolysieren, oder ein behandeltes Produkt der Zellen mit den genannten Fähigkeiten einwirken läßt und die erzeugte Aminosäure gewinnt.

Das "schwer abbaubare Protein oder Peptid, das Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthält," ist in der vorliegenden Erfindung ein Protein oder Peptid (das einen Aminosäurerest einschließen kann, dessen Amino-Gruppe mit einer Benzyloxycarbonylgruppe geschützt ist), das Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste aufweist,

mit üblichen Proteasen nicht hydrolysiert wird und als ein natürliches Protein besonders ein tierisches Kollagen, Casein oder ein ähnliches Protein oder ein pflanzliches Prolamine oder eine entsprechende Verbindung einschließt. Das Peptid ist beispielsweise ein Polypeptid oder Oligopeptid, das durch partielle Hydrolyse der vorstehend beschriebenen Proteine erhalten wird, oder ein im Handel erhältliches, synthetisches Peptid Z-Pro-Hyp, Z-Pro-Pro, Z-Gly-Pro oder ähnliche Verbindungen (Z : Benzyloxycarbonylgruppe, Hyp : Hydroxyprolin).

Eine Fähigkeit zur Hydrolyse eines schwer abbaubaren Proteins oder Peptids zu besitzen" soll ferner bedeuten, daß neben der Fähigkeit zur Hydrolyse üblicher Peptidbindungen mindestens eine, vorzugsweise zwei oder alle Aminosäuren von Z-Pro-Pro, Z-Pro-Hyp und Z-Gly-Pro hydrolysiert werden können.

Jeder zur Gattung Xanthomonas gehörende und die vorstehend beschriebene Fähigkeit besitzende Mikroorganismus kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Von Xanthomonas maltophilia stammende Mikroorganismen mit der vorstehend beschriebenen Fähigkeit sind bevorzugt, insbesondere Xanthomonas maltophilia NA-62 (FERM-BP-4479) und Xanthomonas maltophilia JCM Nr. 3807 (FERM-BP-4474). Die Xanthomonasart JCM Nr. 3857 (FERM-BP-4475) ist ebenfalls bevorzugt.

In der vorstehenden Beschreibung ist NA-62 eine private Kennzeichnung, JCM eine Abkürzung für Japan Collection of Microorganisms and FERM-BP eine internationale Hinterlegung beim National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry, Japan, gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags über die Hinterlegung von Mikroorganismen. Die mikrobiellen Eigenschaften der Gattung Xanthomonas und Xanthomonas maltophilia werden ferner in Krieg, N. R. et al., "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Bd. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, S. 140-219 (1984), beschrieben. Außerdem ist Xanthomonas maltophilia NA-62 der gleiche Stamm wie der in der vorstehend erwähnten japanischen Veröffentlichung, nicht-geprüften Patentanmeldung Nr. 236960/1993 beschriebene Xanthomonas NA-62, wobei die Patentanmeldung auch eine Beschreibung seiner mikrobiellen Eigenschaften enthält. Es wurde festgestellt, daß der Stamm NA-62 zu Xanthomonas maltophilia gehört, wobei er dadurch gekennzeichnet ist, daß in der Fettsäurezusammensetzung der Zelle verzweigte Fettsäuren, beispielsweise große Mengen Isopentadecansäure und Isoheptadecansäure und verzweigte Hydroxyfettsäuren, beispielsweise 3-Hydroxyisoundecansäure und 3-Hydroxyisotridecansäure, enthalten sind. In diesem Zusammenhang hält man eine solche Fettsäurezusammensetzung für ein Merkmal von Xanthomonas maltophilia (vgl. beispielsweise Swings, J. et al., Int. J. Syst. Bac. 33 (1983), 409, C. Wayne Moss et al., J. Bac. 114 (1973), 1018). Ferner bestätigte sich, daß die Fettsäurezusammensetzung der Zelle einem Mikroorganismus entsprach, von dem bekannt ist, daß er zu Xanthomonas maltophilia gehört.

Eine Aminosäure kann erfindungsgemäß produziert werden, indem (hier nachstehend als das erste Verfahren bezeichnet) ein Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas, der ein schwer abbaubares Protein oder Peptid hydrolysieren kann, in einem Medium gezüchtet wird, das ein schwer abbaubares Protein oder Peptid enthält, das Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste aufweist (nachstehend wird "ein schwer abbaubares Protein oder Peptid, das Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste" enthält, gelegentlich lediglich als "ein schwer abbaubares Protein oder Peptid" bezeichnet).

Eine Aminosäure kann auch erfindungsgemäß produziert werden, indem mikrobielle Zellen, die durch Züchten eines Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas, der ein schwer abbaubares Protein oder Peptid hydrolysieren kann, in einem üblichen Medium und anschließendes Sammeln der Zellen erhalten werden, mit dem schwer abbaubaren Protein oder Peptid in einem wässrigen Medium in Kontakt gebracht werden (nachstehend als das zweite Verfahren bezeichnet).

Zunächst wird das erste Verfahren beschrieben. Ein derartiger Mikroorganismus wird in einem Medium gezüchtet, das Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, die als Hauptbestandteil ein schwer abbaubares Protein oder Peptid umfassen, anorganische Stoffe und Mikronährstoffe enthält, unter aeroben Bedingungen bei einer eingestellten Temperatur, einem eingestellten pH-Wert, etc.

Als Kohlenstoffquellen werden üblicherweise verschiedene Kohlenhydrate verwendet, beispielsweise Glucose, Saccharose, Mannose, Stärke, Stärkehydrolysate und Restmengen, es können allerdings auch je nach Assimilierbarkeit verschiedene organische Säuren, beispielsweise Brenztraubensäure, Fumarsäure, Milchsäure und Essigsäure, Alkohole, beispielsweise Ethanol, Glycerin und Polyalkohol, und Kohlenwasserstoffe, beispielsweise n-Paraffin, verwendet werden. Als Stickstoffquellen können ein oder mehrere schwer abbaubare Proteine oder Peptide verwendet werden, andere Stickstoffquellen können jedoch auch verwendet werden. Als weitere Stickstoffquellen können verwendet werden: Ammoniak, verschiedene anorganische und organische Ammoniumsalze, beispielsweise Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumacetat, Harnstoff und andere Stickstoff enthaltende Verbindungen und verschiedene Stickstoff enthaltende natürliche Produkte, beispielsweise Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Maisquellwasser, Caseinhydrolysate, Fischmehl oder sein Aufschlußprodukt, entfetteter Sojabohnenkeuchen oder sein Aufschlußprodukt und Chrysalishydrolysate. Es gibt keine bestimmte gemeinsame Obergrenze der Menge schwer abbaubaren Proteins oder Peptids für alle Stickstoffquellen, die Menge ist jedoch vorzugsweise 10 bis 100 Gew.-%, insbesondere 50 bis 100 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse.

Als anorganische Stoffe können primäres Kaliumphosphat, sekundäres Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Eisensulfat, Mangansulfat, Calciumcarbonat, etc. verwendet werden. Obwohl es notwendig ist, dem Medium geeignete, für das Wachstum des verwendeten Mikroorganismus erforderliche Mengen Mikronährstoffe (Vitamine, Nucleinsäuren, etc.) zuzusetzen, sind diese Substanzen gegebenenfalls schon mit den natürlichen, als Stickstoffquelle verwendeten Produkten zugesetzt.

Obwohl es üblich ist, daß die gesamte Menge des schwer abbaubaren Proteins oder Peptids zu Beginn des Züchtens vollständig im Medium vorhanden ist, kann die Gesamtmenge auch nach und nach oder zu einem bestimmten Zeitpunkt während des Züchtens (z. B. während der logarithmischen Phase) zugesetzt werden. Obwohl es keine bestimmte Obergrenze für die Konzentration des schwer abbaubaren Proteins oder Peptids im

Medium gibt, werden üblicherweise 0,1 bis 20 g/l verwendet.

Eine Züchtung durch ein aerobes Kulturverfahren ist optimal, beispielsweise durch ein Schüttelkulturverfahren oder ein belüftetes Rührkulturverfahren, es kann jedoch auch ein flüssiges Standkulturverfahren geeignet kombiniert werden. Obwohl sich die Kulturbedingungen je nach Art des Mikroorganismus unterscheiden, ist üblicherweise eine Züchtungstemperatur von 15 bis 45°C, besonders von 25 bis 35°C, und ein pH-Wert des Mediums von 5 bis 8 geeignet. Es wird unter derartigen Bedingungen üblicherweise 10 Stunden bis 10 Tage, vorzugsweise 24 Stunden bis 6 Tage, gezüchtet. In den vorstehend beschriebenen Verfahren kann der Hauptteil der Aminosäuren extrazellulär angereichert werden.

Es wird nun das zweite Verfahren beschrieben. Zunächst wird ein in dieser Erfindung verwendeter Mikroorganismus in der dem ersten Verfahren entsprechenden Weise gezüchtet. Obwohl unter diesen Bedingungen üblicherweise kein schwer abbaubares Protein oder Peptid als Stickstoffquelle verwendet wird, kann es verwendet werden.

Nach einer ausreichenden Vermehrung des Mikroorganismus wird die Züchtung beendet und die Zellen durch Zentrifugation, Filtration oder entsprechende Verfahren isoliert, falls erforderlich, gewaschen und die erhaltenen Zellen oder ein behandeltes Produkt, das durch ihre Behandlung erhalten wird, mit einem schwer abbaubaren Protein oder Peptid in einem wässrigen Medium in Kontakt gebracht.

Behandelte Produkte werden durch Zerstörung der Zellen erhalten (Produkte, die durch Aufbrechen, Trocknen, etc. der Zellen erhalten werden). Es können Enzyme sein, beispielsweise Rohenzyme, gereinigte Enzyme und immobilisierte Enzyme, die aus den durch Aufbrechen der Zellen erhaltenen Produkten gewonnen wurden und das schwer abbaubare Protein oder Peptid hydrolysieren können. Das Aufbrechen der Zellen kann gemäß einem üblichen Verfahren durchgeführt werden, beispielsweise unter Verwendung einer Zelmühle unter Schütteln, eines unter hohem Druck arbeitenden, Zellen zerstörenden Geräts (Hughes-Presse, French-Presse oder ähnliches), einer mit (Ultra-)Schall arbeitenden, Zellen zerstörenden Maschine oder entsprechende Geräte. Es kann außerdem unter Umständen auch ein Trocknungsverfahren oder ein die Zellwand abbaubares Verfahren verwendet werden. Nach der Entfernung der Zelltrümmer aus den durch Zellzerstörung erhaltenen Produkten oder deren wässriger Suspension kann ein Rohenzym oder ein gereinigtes Enzym durch eine der Erfordernissen angepasste Kombination folgender Schritte erhalten werden: Aussalzen unter Verwendung von Ammoniumsulfat oder entsprechender Verbindungen, Lösungsmittelfällung unter Verwendung von Ethanol, Aceton, Methanol, Isopropanol oder entsprechenden Produkten, Ausfällung am isoelektrischen Punkt, fraktionierende Adsorption unter Verwendung eines Adsorptionsmittels, beispielsweise saurer Tonerde, Bentonit, Kaolin, Aktivkohle oder Aluminium-Cry-Gel, unterschiedliche Chromatographieverfahren, Elektrophorese, etc., sowie Dialyse, Ultrafiltration, Konzentrierung, Entfernung der Nucleinsäure, etc. Es können unterschiedliche Chromatographieverfahren zur Verwendung geeignet sein, beispielsweise eine Gelchromatographie, bei der die Fraktionierung mittels Molekülgröße unter Verwendung des Molekularsiebeffekts (Gelfiltration) durchgeführt wird, Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Cellulose oder Dextran, an die (das) eine Ionen austauschende Gruppe gebunden ist, oder ein Ionenaustauscherharz, Adsorptionschromatographie unter Verwendung von Hydroxylapatit, Affinitätschromatographie unter Verwendung einer spezifischen Bindungsreaktion zwischen einem Träger (Cellulose oder Dextran) oder ein entsprechendes Produkt, der ein daran gebundenes Substrat, einen spezifischen Inhibitor, ein Coenzym oder ein Derivat davon aufweist, und dem Zielenzym und hydrophobe Chromatographie unter Verwendung einer hydrophoben Bindungsreaktion zwischen dem hydrophoben Teil der Säulenfüllung und dem Enzym. Als Elektrophorese kann die Zonelektrophorese in einem Trärgel oder Elektrofokussierung durch Elektrophorese in einem pH-Gradienten verwendet werden.

In den vorstehend beschriebenen Verfahren kann die Bewegung des Zielenzymen unter Verwendung der spezifischen Aktivität als Marker verfolgt werden.

Die Zerstörung der Zellen und die Enzymreinigung kann beispielsweise durch ein in "Jikken Noge Kagaku" (Experimental Agricultural Chemistry), letzter Band, 3. Ausgabe, herausgegeben von Agricultural Chemistry Classroom, Department of Agriculture, Tokyo University, veröffentlicht von Asakura-shoten (März 1992), Seiten 42—95, beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.

Ein spezifisches Beispiel, in dem ein gereinigtes Enzym durch Nacharbeitung dieser Erfindung erhalten wurde, ist nachstehend im Hinblick auf die Verwendung von Xanthomonas maltophilia NA-62 beschrieben. Die Reinigung eines Enzyms von einem anderen in dieser Erfindung verwendeten Mikroorganismus kann ebenfalls in etwa der gleichen Weise durchgeführt werden.

Zunächst wird eine Kulturbühe von Xanthomonas maltophilia NA-62 zentrifugiert und die ausgefällten Zellen werden gewonnen, in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) suspendiert und durch Ultraschall aufgebrochen. Nach der Zentrifugation dieses fraktionierten Produkts wird der Zellextrakt gewonnen, anschließende Arbeitsschritte werden bei 4°C durchgeführt.

Zunächst wird dieser Zellextrakt mit Ammoniumsulfat fraktioniert und die Fraktionen mit 35 bis 50% Sättigung gewonnen. Anschließend wird die nachstehende Chromatographie durchgeführt, wobei Proteine durch Absorption bei 280 nm nachgewiesen werden.

Der durch die Ammoniumsulfat-Fraktionierung erhaltene Niederschlag wird in 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) gelöst, dialysiert und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Q-Sepharosesäule (2,6 × 10 cm, Pharmacia Co.) aufgetragen. Eine Anionen-Austauschchromatographie, bei der mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,3 M NaCl eluiert wird, wird durchgeführt, wobei eine aktive Fraktion erhalten wird.

Anschließend wird Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 30% in dieser aktiven Fraktion gelöst, die Lösung auf eine Phenyl-Superoseäule (0,5 × 5 cm, Pharmacia Co.) aufgetragen, die mit 50 mM zu 30% mit Ammoniumsulfat gesättigten bis-Tris-HCl-Puffer (pH 6,5) äquilibriert ist, und eine hydrophobe Chromatographie durchgeführt. Die Elution wird mit einem linearen Gradienten mit abnehmender Ammoniumsulfatkonzentration durchgeführt und die aktiven Fraktionen gewonnen.

Anschließend wird diese aktive Fraktion gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, der 0,4 mM CaCl_2 enthält, (pH 6,8) dialysiert und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Hydroxylapatitsäule ($0,8 \times 10$ cm, Tönnies Corporation) aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit dem zur Äquilibrierung verwendeten Puffer wird die Elution mit einem linearen Gradienten zwischen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, der 0,014 mM CaCl_2 enthält, (pH 6,8) und 0,4 M Kaliumphosphatpuffer, der 0,014 mM CaCl_2 enthält, (pH 6,8) durchgeführt. Die aktiven Fraktionen werden gewonnen und der nachstehend beschriebenen Gelchromatographie unterzogen.

Die aktiven Fraktionen werden auf eine Superdex 200-Säule ($1,6 \times 60$ cm, Pharmacia Co.) aufgetragen, die mit 50 mM bis-Tris-HCl-Puffer, der 200 mM NaCl enthält, (pH 6,5) äquilibriert ist, mit einer Fließrate von 0,5 ml/min eluiert und das Eluat in 1 ml Portionen fraktioniert. Die aktive Substanz wird in den Fraktionen 69 bis 71 als ein einzelner Proteipeak gewonnen. Das Molekulargewicht wird als 160 000 bestimmt. Das erhaltene Enzym zeigte ferner sowohl bei der isoelektrischen Fokussierung als auch der SDS-Elektrophorese eine einzelne Bande und ist damit als ein einheitliches Protein anzusehen.

Als Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen können ein Trägerbindungsverfahren erwähnt werden, bei dem ein Enzym durch eine kovalente Bindung, Ionenbindung, Adsorption oder in entsprechender Weise an einen Träger gebunden ist, ein Vernetzungsverfahren, bei dem Enzymmoleküle durch kovalente Bindung wechselseitig gebunden sind, ein Immobilisierungsverfahren durch Einschluß, bei dem ein Enzym in die Netzwerkstruktur eines Makromoleküls, etc. eingeschlossen ist. Jedes dieser Verfahren kann bei der Herstellung von immobilisierten Enzymen bei der Nacharbeitung dieser Erfindung verwendet werden. Die Verwendung eines immobilisierten Enzyms ist vorteilhaft, da es nach der enzymatischen Umsetzung von Substrat und Produkt getrennt und erneut wiederholt verwendet werden kann.

Obwohl die Verwendung einer größeren Menge mikrobieller Zellen oder des behandelten Produkts der Zellen für die Umsetzung vorteilhaft wäre, ist eine zu große Menge wirtschaftlich von Nachteil. Da auch die Mikroorganismen und die behandelten Produkte der Zellen in unterschiedlichem Ausmaß schwer abbaubare Proteine oder Peptide hydrolysieren können, ist die zu verwendende Menge nicht festgelegt. Bei der Verwendung von mikrobiellen Zellen ist jedoch üblicherweise eine Menge von 1 bis 100 mg an schwer abbaubarem Protein oder Peptid pro mg Zellen (getrocknete Zellen) und bei der Verwendung des behandelten Produkts der Zellen eine Menge von 0,01 bis 5 g schwer abbaubarem Protein oder Peptid pro Einheit Enzymaktivität (1 E) zur Verwendung geeignet. In diesem Zusammenhang bezeichnet E eine Enzymaktivität, die 1 μmol eines Substrats Z-Pro-Hyp in 1 Minute bei 37°C hydrolysiert. Ferner ist die zur Verwendung geeignete Konzentration des schwer abbaubaren Proteins oder Peptids nicht ausdrücklich beschränkt, sie ist jedoch geeigneterweise 0,01 bis 20 g/dl.

Als wäßriges Medium können beispielsweise Wasser, ein Puffer oder ähnliches erwähnt werden. Wenn ferner ein durch Aufbrechen von Zellen erhaltenes Produkt als eine Enzymquelle verwendet wird, enthält es bereits ein wäßriges Medium, und es ist nicht immer erforderlich, zusätzlich noch ein wäßriges Medium zu verwenden. Als Puffer können Phosphatpuffer, Succinatpuffer, Citratpuffer, Tris-HCl-Puffer, Boratpuffer, Acetatpuffer, Glycylglycinpuffer, etc. verwendet werden.

Der Kontakt der mikrobiellen Zellen oder des behandelten Produkts der Zellen mit dem schwer abbaubaren Protein oder Peptid in einem wäßrigen Medium wird je nach Art der Mikroorganismen unterschiedlich durchgeführt, wird jedoch üblicherweise bei einem pH-Wert von 5 bis 8 und bei einer Temperatur von 20 bis 80°C, vorzugsweise 30 bis 70°C, durchgeführt. Die Kontaktzeit ist üblicherweise 0,5 bis 48 Stunden, vorzugsweise 0,5 bis 24 Stunden.

In jeder Ausführungsform des ersten und zweiten Verfahrens wird die Reaktion nach Abschluß der Umsetzung durch ein geeignetes Verfahren beendet, beispielsweise durch Entfernung der Zellen oder Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen des Reaktionsgemisches oder Erniedrigung des pH-Werts (Zugabe einer Säure, wie beispielsweise Chlorwasserstoffsäure), und eine Membranbehandlung unter Verwendung einer Ultrafiltrationsmembran oder Filtrationsmembran für umgekehrte Osmose oder entsprechender Produkte, Adsorptionsbehandlung unter Verwendung eines Adsorptionsmittels, beispielsweise Aktivkohle, und weitere an sich bekannte Verfahren werden in einer geeigneten Kombination verwendet, um eine Lösung eines Aminosäuregemisches zu erhalten. Ferner kann erfindungsgemäß eine gewünschte Aminosäure (z. B. Hydroxyprolin, Prolin oder Peptide) aus einem solchen Aminosäuregemisch unter Verwendung beispielsweise eines Ionenaustauschchromatographieverfahrens isoliert werden. Das erfindungsgemäß erhaltene Hydroxyprolin ist trans-4-Hydroxy-L-prolin, das als ein Grundstoff für Arzneimittel, wie beispielsweise Carbenem-Antibiotika, nützlich ist, wie vorstehend beschrieben, und trans-4-Hydroxy-L-prolin kann in der vorliegenden Erfindung besonders effizient und selektiv hergestellt werden (vgl. Testbeispiele 4 und 5).

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Referenzbeispiel 1

Jeder der drei in Tabelle 1 dargestellten, zur Gattung *Xanthomonas* gehörenden Stämme wurde in 100 ml eines in Tabelle 2 dargestellten Flüssigmediums in eine konische, mit einer Schikane ausgerüsteten 500 ml Flasche inokuliert und 72 Stunden bei 30°C unter Schütteln gezüchtet. Danach wurde die Kulturbühe zentrifugiert (15 000 UpM, 20 Minuten), die ausgefällten Zellen gesammelt und unter Verwendung eines Ultraschallhomogenisators (US-150, Nippon Seiki Seisaku-sho Co.) aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 000 UpM, 15 Minuten) aus der erhaltenen Suspension entfernt, der erhaltene Überstand auf 80% Sättigung mit Ammoniumsulfat eingestellt und der Niederschlag als Rohprodukt durch Zentrifugation (15 000 UpM, 20 Minuten) gesammelt. Der Niederschlag wurde in 1 ml 50 mM bis-Tris-HCl-Puffer (pH 6,5, 200 mM Natriumchlorid enthaltend) suspendiert, wobei eine Rohenzymlösung erhalten wurde.

Testbeispiel 1

Test auf Hydrolyseaktivität des synthetischen Peptids

5 Eine durch Auflösen eines kommerziellen synthetischen Peptids Z-Pro-Hyp, Z-Pro-Pro oder Z-Gly-Pro in 50 mM bis-Tris-HCl-Puffer (pH 6,5) in einer Konzentration von 1 mM erhaltene Lösung wurde als Substratlösung verwendet. 25 µl der im Referenzbeispiel 1 erhaltenen Rohenzymlösung und 25 µl 50 mM bis-Tris-HCl-Puffer (pH 6,5, 200 mM Natriumchlorid enthaltend) wurden zu 50 µl dieser Substratlösung zugesetzt und das Gemisch nach ausreichendem Rühren 60 Minuten bei 37°C umgesetzt. 4 µl 1 N Chlorwasserstoffsäure wurden zugesetzt, um die Umsetzung zu beenden.

10 Die Konzentration einer freien Aminosäure (Prolin oder Hydroxyprolin) in der Reaktionslösung wurde unter Verwendung eines automatischen Aminosäureanalysators (Hitachi L-8500) getestet und eine Hydrolyserate durch Vergleichen des erhaltenen Werts mit der Konzentration (theoretischer Wert) der zum Zeitpunkt der kompletten Hydrolyse produzierten (freien) Aminosäure berechnet.

15 Als Vergleichsbeispiel wurden 25 µl einer Flüssigkeit, die durch Suspension eines im Handel erhältlichen Proteasepräparats "Actinase" (von Streptomyces griseus stammend, Kaken Pharmaceutical Co.) erhalten wurde, anstelle der vorstehend beschriebenen Rohenzymlösung zugesetzt (25 000 000 Tyrosineinheiten davon wurden pro mMol des synthetischen Peptids zugesetzt). Diese Enzympräparation weist eine bei Proteolysen häufig verwendete, extrem starke proteolytische Kraft auf.

20 Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Wie aus der Tabelle 3 zu ersehen ist, zeigten alle Rohenzymlösungen, die von den drei in diesem Test verwendeten Stämmen der Gattung Xanthomonas hergestellt worden waren, eine hydrolytische Aktivität bei Z-Pro-Hyp und Z-Pro-Pro, und es wurde festgestellt, daß diese Stämme das Enzym produzieren können. Ferner wurde die Hydrolyse von Z-Gly-Hyp in der Rohenzymlösung, die von einem zur Gattung Xanthomonas

25 gehörenden Stamm hergestellt worden war, beobachtet. Andererseits hydrolysierte die Actinase keines der synthetischen Peptide.

Testbeispiel 2

30 Test der hydrolytischen Aktivität bei Gelatine

Gelatine (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) wurde zur Herstellung einer 0,5%igen (Gew./Vol.) Gelatinelösung in 50 mM bis-Tris-HCl-Puffer (pH 6,5) gelöst. 50 µl der im Referenzbeispiel 1 hergestellten Rohenzymlösung wurden zu 50 µl dieser Gelatinelösung zugesetzt, das Gemisch ausreichend gerührt und 24 Stunden bei 37°C umgesetzt. Anschließend wurden 4 µl 1 N Chlorwasserstoffsäure der Reaktionslösung zugesetzt, um die Umsetzung zu beenden. Durch Messung der freien Aminosäurekonzentration in dieser Reaktionslösung wurde die Aktivität bei der Hydrolyse der Gelatine, d. h., die die Aminosäuren aus der Gelatine freisetzende Aktivität, bestimmt. Der Test der freien Aminosäurekonzentration wurde gemäß einem Phenylthiocarbonyl-(PTC)-Aminosäure-Analyse-System (Waters Co.) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis der Menge einer freigesetzten Aminosäure (die Hydrolyse mit Chlorwasserstoffsäure wird als 100% angenommen) zur Menge einer im Ausgangsmaterial der Gelatine enthaltenen Aminosäure ausgedrückt.

40 Als Vergleichstest wurden 50 µl einer Flüssigkeit, die durch Suspension der Actinase in 50 mM bis-Tris-HCl-Puffer (pH 6,5, 200 mM Natriumchlorid enthaltend) erhalten wurden, zugesetzt (100 000 Tyrosineinheiten wurden pro g Gelatine zugesetzt).

45 Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Wie aus der Tabelle 4 zu ersehen ist, zeigten alle Rohenzymlösungen, die von den Mikroorganismen hergestellt worden waren, die zur Gattung Xanthomonas gehören und in diesem Test verwendet wurden, eine starke Aktivität bei der Freisetzung von Hydroxyprolin und Prolin aus Gelatine. Obwohl andererseits eine Freisetzung von Hydroxyprolin und Prolin durch die Actinase beobachtet wurde, waren die durch sie erhaltenen Mengen

50 vergleichsweise viel geringer.

Testbeispiel 3

Die Xanthomonasart JCM Nr. 3857 (FERM-BP-4475) wurde unter Verwendung eines Mediums, das Gelatine als Hauptstickstoffquelle, wie in Tabelle 5 dargestellt, enthält, 72 Stunden bei 30°C unter Schütteln gezeichtet. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 000 UpM, 20 Minuten) entfernt, der Kulturüberstand mit "Sep-Pak-Cartridges" (C18, Waters Co.) behandelt, um hydrophobe Verunreinigungen zu entfernen, und die Konzentrationen der freien Aminosäuren unter Verwendung eines PTC-Aminosäure-Analysesystems (Waters Co.) getestet.

60 Die Testergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Wie in Tabelle 6 dargestellt, war der Gehalt an freiem Hydroxyprolin in der Kulturbühe 2,49 g/l, und 73,3% des im Protein enthaltenen Hydroxyprolins wurden im Medium als freies Hydroxyprolin gewonnen. So wurde gezeigt, daß Aminosäuren auch durch ein semifermentatives Verfahren unter Verwendung des Mikroorganismus aus Gelatine hergestellt werden können.

65 Testbeispiel 4

Xanthomonas maltophilia NA-62 (FERM-BP-4479) wurde unter Verwendung von zwei Flüssigmedien A und

B, die Gelatine als Hauptstickstoffquelle, wie in Tabelle 7 dargestellt, enthielten, 72 Stunden bei 30°C unter Schütteln gezüchtet. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 000 UpM, 20 Minuten) entfernt, hydrophobe Verunreinigungen mit "Sep-Pak-Cartridges" (C18, Waters Co.) aus dem Kulturlüberstand entfernt und die Konzentrationen der freien Aminosäuren unter Verwendung eines PTC-Aminosäure-Analysesystems (Waters Co.) getestet.

Die Testergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt, in der die Menge jeder aus der Kulturbühe gewonnenen Aminosäure so angegeben wird, daß sie sich auf eine 100%ige Hydrolyse mit Chlorwasserstoffsäure bezieht. Ferner ist auch der Anteil von Hydroxyprolin an der Gesamtmenge der Aminosäuren in der Kulturbühe dargestellt.

Wie in Tabelle 8 dargestellt, konnte Hydroxyprolin durch das semifermentative Verfahren unter Verwendung des Mikroorganismus nicht nur mit einer hohen Ausbeute, sondern auch mit einem hohen Gesamtgehalt an Aminosäuren gewonnen werden. Daher kann eine effiziente Herstellung von Hydroxyprolin durch diese Erfindung erwartet werden.

Testbeispiel 5

Xanthomonas maltophilia JCM Nr. 3807 (FERM-BP-4474) wurde unter Verwendung eines Flüssigmediums, das Gelatine als Hauptstickstoffquelle, wie in Tabelle 9 dargestellt, enthält, 72 Stunden bei 30°C unter Schütteln gezüchtet. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 000 UpM, 20 Minuten) entfernt, hydrophobe Verunreinigungen mit "Sep-Pak-Cartridges" (C18, Waters Co.) aus dem Kulturlüberstand entfernt, und die Konzentrationen der freien Aminosäuren unter Verwendung eines PTC-Aminosäure-Analysesystems (Waters Co.) getestet.

Die Testergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt, in der die Menge jeder aus der Kulturbühe gewonnenen Aminosäure so angegeben wird, daß sie sich auf eine 100%ige Hydrolyse mit Chlorwasserstoffsäure bezieht. Ferner ist auch der Anteil von Hydroxyprolin an der Gesamtmenge der Aminosäuren in der Kulturbühe dargestellt.

Wie in Tabelle 10 dargestellt, konnte Hydroxyprolin durch das semifermentative Verfahren unter Verwendung des Mikroorganismus nicht nur mit einer hohen Ausbeute, sondern auch mit einem hohen Gesamtgehalt an Aminosäuren gewonnen werden. Daher kann eine effiziente Herstellung von Hydroxyprolin durch diese Erfindung erwartet werden.

Gemäß der vorstehend beschriebenen Erfindung können schwer abbaubare Proteine, beispielsweise Collagen, Casein und Prolamin, und davon abstammende Polypeptide oder Oligopeptide unter milden Bedingungen effizient hydrolysiert und Aminosäuren mit hohem Nutzwert, einschließlich Prolin und Hydroxyprolin, hergestellt werden, was bisher lediglich durch chemische Behandlungen, beispielsweise einer sauren Hydrolyse, möglich war. Ferner kann Hydroxyprolin (trans-4-Hydroxy-L-prolin) mit dieser Erfindung aus solchen schwer abbaubaren Proteinen oder Peptiden besonders effizient und selektiv hergestellt werden.

Besonders Aminosäuren, beispielsweise Prolin und Hydroxyprolin, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt werden können, sind als Grundstoffe für die Herstellung von Arzneimitteln nützlich.

Tabelle 1

Mikroorganismen, mit denen Tests durchgeführt wurden

Name des Stamms	Nr.
<i>Xanthomonas maltophilia</i> NA-62	FERM-BP-4479
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	JCM Nr. 3807 (FERM-BP-4474)
<i>Xanthomonas</i> art	JCM Nr. 3857 (FERM-BP-4475)

Tabelle 2

Zusammensetzung des Flüssigmediums

Fleischextrakt	5 (g/l)
Pepton	10
Hefeextrakt	3
Natriumchlorid	3
Glucose	10
Primäres Kaliumphosphat	3
Magnesiumsulfat heptahydrat	5
pH-Wert	7,2

Tabelle 3

Hydrolytische Aktivität bei synthetisierten Peptiden

	Hydrolyserate (%)		
	Z-Pro-Pro	Z-Pro-Hyp	Z-Gly-Pro
Xanthomonas maltophilia NA-62	41,8	30,2	0
Xanthomonas maltophilia	29,5	24,5	34,4
Xanthomonasart	49,3	32,9	0
Actinase (Vergleichsbeispiel)	0	0	0

Tabelle 4

Aktivität bei der Freisetzung von Aminosäuren aus Gelatine

	Hyp	Pro	Asp	Glu	Ser	Gly	Arg	Thr	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Lys
<u>Xanthomonas maltophilia</u> NA - 62	83	36	30	72	100	68	80	0	100	80	100	0	87	100
<u>Xanthomonas maltophilia</u>	33	52	0	10	100	58	60	0	100	20	0	100	16	100
<u>Xanthomonas</u> sp.	65	100	13	91	97	88	100	100	100	100	100	100	87	100
Actinase	7	4	18	23	46	23	49	100	60	92	47	57	56	86

Tabelle 5

Zusammensetzung des Flüssigmediums

	Fleischextrakt	5(g/l)
	Gelatine	50
	Hefeextrakt	5
	Natriumchlorid	3
	Glucose	10
	Primäres Kaliumphosphat	3
	Magnesiumsulfat heptahydrat	5
	pH-Wert	7,2

Tabelle 6

Aktivität bei der Hydrolyse von Gelatine in der Semifermentation

Aminosäure	Produzierte Menge (g/l)	Ausbeute (%)
Hydroxyprolin	2,49	73,3
Asparaginsäure	0,35	14,8
Glutaminsäure	0,41	8,7
Serin	0,34	23,0
Glycin	4,68	52,8
Histidin	0,20	58,0
Arginin	2,50	70,3
Threonin	0,14	18,6
Alanin	0,22	6,1
Prolin	0,20	3,7
Tyrosin	0,38	100
Valin	0,08	7,4
Methionin	0,14	5,6
Isoleucin	0,14	22,2
Leucin	0,06	4,9
Phenylalanin	0,24	16,0
Lysin	0,03	2,0

Tabelle 7

Zusammensetzung des Flüssigmediums

5

	Medium	Medium
	A	B
10	Fleischextrakt	5(g/l)
	Gelatine	10
	Hefeextrakt	5
15	Natriumchlorid	3
	Glucose	10
	Primäres Kaliumphosphat	3
20	Magnesiumsulfatheptahydrat	5
	Natriumcarbonat	—
	Natriumsulfat	—
25	Magnesiumchloridmonohydrat	—
	Eisenchlorid	—
	Zinkchlorid	—
30	Calciumchloriddihydrat	—
	Zitronensäure	—
	Borsäure	—
35	pH-Wert	—

40

45

50

55

60

65

Tabelle 8

Hydrolyse von Gelatine durch Semifermentation

Freigesetzte Aminosäure	Medium A	Medium B	
Hydroxyprolin	99 (%)	72 (%)	
Asparaginsäure	8	9	10
Glutaminsäure	3	1	
Serin	-	Spuren	
Glycin	-	Spuren	15
Histidin	-	-	
Arginin	3	1	
Threonin	8	8	20
Alanin	3	-	
Prolin	-	-	
Tyrosin	Spuren	-	25
Valin	Spuren	-	
Methionin	-	Spuren	
Isoleucin	-	3	30
Leucin	-	-	
Phenylalanin	27	-	
Lysin	Spuren	-	35
Hydroxyprolin- gehalt (%)	76	87	40
im Vergleich zur Gesamtmenge der Aminosäuren			45

Die Ausbeute jeder Aminosäure wurde berechnet unter der Annahme, daß der Wert der Hydrolyse durch Chlorwasserstoffsäure bei 100% liegt.

Spuren: Trotz des Nachweises geringer Mengen war eine quantitative Bestimmung unmöglich.

---: nicht nachgewiesen

Tabelle 9

Zusammensetzung des Flüssigmediums

Fleischextrakt	5 g(l)	
Gelatine	10	
Hefeextrakt	5	
Natriumchlorid	3	60
Glucose	10	
Primäres Kaliumphosphat	3	
Magnesiumsulfat heptahydrat	5	
pH-Wert	7,2	65

Tabelle 10

Hydrolyse von Gelatine durch Semifermentation

	Freie Aminosäure	Ausbeute (%)
5	Hydroxyprolin	86
	Asparaginsäure	8
	Glutaminsäure	2
10	Serin	—
	Glycin	—
	Histidin	20
	Arginin	3
15	Threonin	—
	Alanin	1
	Prolin	—
	Tyrosin	3
	Valin	—
20	Methionin	—
	Isoleucin	3
	Leucin	—
	Phenylalanin	15
25	Lysin	1
	Gehalt (%) an Hydroxyprolin im Vergleich zur Gesamtmenge der Aminosäuren	81

Die Ausbeute jeder Aminosäure wurde berechnet unter der Annahme, daß der Wert der Hydrolyse durch Chlorwasserstoffsäure bei 100% liegt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Aminosäure, bei dem man auf ein Protein oder Peptid, das schwierig abzubauen ist und Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthält, Zellen eines Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas, der die Fähigkeit besitzt, das Protein oder Peptid zu hydrolysieren, oder ein behandeltes Produkt der Zellen mit der genannten Fähigkeit einwirken läßt und die erzeugte Aminosäure gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellen des Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas durch Züchten des Mikroorganismus in einem Medium, das das Protein oder Peptid enthält, auf das Protein oder Peptid einwirken.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellen des Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas oder das behandelte Produkt der Zellen durch Inkontakthringen der Zellen oder des behandelten Produkts der Zellen mit dem Protein oder Peptid in einem wäßrigen Medium auf das Protein oder Peptid einwirken.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem der Mikroorganismus ein Mikroorganismus der Art Xanthomonas maltophilia mit der entsprechenden Fähigkeit oder Xanthomonas JCM 3857 (FERM-BP-4475) ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem der Mikroorganismus Xanthomonas maltophilia NA-62 (FERM-BP-4479) oder JCM 3807 (FERM-BP-4474) ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem das behandelte Produkt der Zellen ein durch Zerstörung der Zellen erhaltenes Produkt oder ein Enzym ist, das aus dem durch die Zerstörung der Zellen erhaltenen Produkt erhalten wurde und eine Fähigkeit zur Hydrolyse des schwer abbaubaren Proteins oder Peptids besitzt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem das schwer abbaubare Protein Collagen, Casein oder Prolamin ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem das schwer abbaubare Peptid ein Polypeptid oder Oligopeptid ist, das durch partielle Hydrolyse von Collagen, Casein oder Prolamin erhalten wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Aminosäure Hydroxyprolin, Prolin oder ein Gemisch von Aminosäuren ist.
10. Verfahren zur Herstellung von trans-4-Hydroxy-L-prolin, bei dem man auf ein Protein oder Peptid, das schwierig abzubauen ist und Prolin- und/oder Hydroxyprolinreste enthält, Zellen eines Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas, der die Fähigkeit besitzt, das Protein oder Peptid zu hydrolysieren, oder ein behandeltes Produkt der Zellen mit der genannten Fähigkeit einwirken läßt und das erzeugte trans-4-Hydroxy-L-prolin gewinnt.